

VERÄNDERUNGEN DER MITTELOHRSCHEIMHAUT
VON LABORRATTEN NACH EINBRINGEN
VON MENSCHLICHEN LEUKOZYTEN-PROTEASEN

Angelika Eberding

1979

Dissertations- und Fotodruck ANNELIESE SCHUBERT
Corneliusstraße 21 · 8000 München 5 · Telefon 268177

Aus der Klinik und Poliklinik
für Hals-, Nasen- und Ohrenkrankheiten
der Universität München

Direktor: Prof. Dr. med. H.H. Naumann
Biochem.Labor: Leiter Prof. Dr. K. Hochstraßer

VERÄNDERUNGEN DER MITTELOHRSCHEIMHAUT VON
LABORRATTEN NACH EINBRINGEN VON MENSCH-
LICHEN LEUKOZYTEN-PROTEASEN

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde in der Zahnmedizin
an der Ludwig Maximilians-Universität
zu München



vorgelegt von

Angelika Eberding
aus München

München 1979

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. med. H.H. Naumann

Mitbereichterstatter: Prof. Dr. K. Hochstraßer

Dekan: Prof. Dr. med. W. Spann

Tag der mündlichen Prüfung: 18.12.1979



Herrn Prof. Dr. H.H. Naumann danke ich für die guten Arbeitsbedingungen.

Mein weiterer Dank gilt Herrn Prof. Dr. K. Hochstraßer für die Überlassung des Themas und sein Interesse an der Arbeit. Ebenso für die Bereitstellung eines Arbeitsplatzes in seinem Labor und für seine wertvollen Ratschläge.

Daneben gilt mein Dank auch Frau S. Heindl und Fräulein K. Lempart für die tatkräftige Unterstützung im Labor.

Herrn Prof. Dr. Loeweneck vom Anatomischen Institut danke ich für seine Hilfe beim Erstellen der histologischen Aufnahmen.

VERZEICHNIS DER VERWENDETEN ABKÜRZUNGEN

α_1 -AT	=	α_1 -Antitrypsin
PMN	=	polymorphkernige Leukozyten
MG	=	Molekulargewicht
CT	=	Chymotrypsin
α_2 -MG	=	α_2 -Makroglobulin
CBZ-Gly-Leu-Ala-CMK	=	Carbobenzoxy-L-glycyl-L-leucyl-L-alanin Chlormethylketon
CBZ-gly-leu-phe-ala-CMK	=	Carbobenzoxy-L-glycyl-L-leucyl-L-phenyl-alanin Chlormethylketon
AAACK	=	N-acetyl-L-alanyl-L-alanyl-L-alanin Chlormethylketon
AAPACK	=	N-acetyl-L-alanyl-L-alanyl-L-prolyl-L-alanyl Chlormethylketon
Boc-Ala-ONp	=	tertiärer Butyloxycarbonyl-alanin-p-nitrophenyl-ester
Suc-Ala ₃ -NHNP	=	3-Carboxypropionyl-L-alanyl-L-alanyl-L-alanin-p-nitroanilid



Digitized by the Internet Archive
in 2026

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
A Einleitung	1
B Theoretischer Teil	3
I. Proteasen	3
II. Granulozyten	3
1. Granula	4
2. Phagozytose	5
III. Beschreibung der neutralen Granulozyten-Proteasen	5
1. Elastase	6
2. Kollagenase	8
3. Chymotrypsin-ähnliches Enzym	9
4. Fibrinolytische Enzyme	10
IV. Inhibitoren	10
1. Serum-Inhibitoren	11
2. Gewebsinhibitoren	12
3. Inhibitoren anderer natürlicher Herkunft	13
4. Synthetische Inhibitoren	13
V. Physiologische Rolle der Elastase	14
VI. Synthetische Elastase-Substrate	16
C Ergebnisse	
I. Gewinnung von Leukozyten-Proteasen aus menschlichen Blutkonserven	18
II. Veränderungen der Mittelohrschleimhaut von Laborratten nach Einbringen von	19

	Seite
1. Leukozyten-Proteasen	19
a) nach 1-maliger Applikation	19
b) nach 3-maliger Applikation	19
c) nach 5-maliger Applikation	19
2. Papain	20
a) nach 1-maliger Applikation	20
b) nach 3-maliger Applikation	20
c) nach 5-maliger Applikation	20
III. Veränderungen der Mittelohrschleimhaut von Laborratten nach Einbringen von	21
1. inaktivierten Leukozyten-Proteasen	21
2. inaktiviertem Papain	21
D Diskussion	22
E Experimenteller Teil	24
I. Versuchsanordnung	24
1. Gewinnung der Leukozyten-Proteasen	24
2. Aktivitätsbestimmung	25
3. Inaktivierung	25
II. Versuchsdurchführung	27
III. Versuchsablauf	36
F Zusammenfassung	37
G Literaturverzeichnis	38
Bild-Anhang	

A EINLEITUNG

Proteolytischen Vorgängen im menschlichen Körper wird seit einigen Jahren bei der Pathogenese verschiedener Erkrankungen große Bedeutung beigemessen.

Durch Leukozytenzerfall im Verlauf einer Entzündung werden Proteasen freigesetzt, die ihre Aktivität nicht nur gegen die Erreger richten, sondern auch das umliegende Gewebe angreifen können.

Im physiologischen Normalfall stehen dem Organismus natürliche Proteasen-Inhibitoren zur Verfügung, die das Gewebe vor dem Angriff der Enzyme schützen.

Als Hauptinhibitor ist das Serum-Protein α_1 -AT zu nennen, das v.a. Trypsin, Chymotrypsin, Elastase sowie leukozytäre Proteasen zu hemmen vermag.

Bei Patienten mit einem isolierten Mangel an diesem Inhibitor konnten LAURELL, ERIKSSON (30) ein vermehrtes Auftreten von Lungenemphysemen feststellen. Da die leukozytären Proteasen nicht mehr in ausreichendem Maße gehemmt werden, richten sie ihre Aktivität gegen das Lungenparenchym bzw. den Bronchialbaum. Es kommt zu destruktiven Prozessen, die im weiteren Verlauf zu einem Lungenemphysem führen können.

Nicht nur in der Pathogenese des Lungenemphysems ist man auf die Bedeutung der Leukozyten-Proteasen gestoßen, auch bei Entzündungen der Blutgefäße vermutet man eine entscheidende Beteiligung der leukozytären Enzyme, da unter ihrer Einwirkung die *Elastica interna* in vitro Veränderungen zeigt, die in vivo bei der akuten Arteritis beim Menschen beobachtet werden können.

Auch im Mittelohr vermutet man eine ursächliche Beteiligung der Leukozyten-Proteasen an destruktiven Vorgängen.

GÜNNEL (15) untersuchte histologisch Felsenbeine von chronischen Otitiden und akuten Otitiden auf Veränderungen in der Gehörknöchelchenkette, da nach entzündlichen Vorgängen im Mittelohr Schallleitungsstörungen beobachtet wurden.

In mehreren Schnittserien sah er Entzündungen verschiedenen Ausmaßes an der Schleimhaut und lakunäre Resorptionserscheinungen am Knochen der Ossicula.

Da in den Ohrsekreten chronischer und akuter Schleimhauteiterungen proteolytische Aktivität von HOCHGESAND/HOCHSTRASSER (17) nachgewiesen werden konnte, liegt es nahe, als Ursache der Gewebeschädigung die leukozytären Proteasen anzusehen.

In dieser Arbeit sollte die Wirkung von menschlichen Leukozyten-Proteasen und, als Vergleich, die der pflanzlichen Protease Papain auf die Schleimhaut und den Knochen des Mittelohres von Ratten experimentell gezeigt werden.

B THEORETISCHER TEIL

I. PROTEASEN

Unter Proteasen versteht man Enzyme des Proteinabbaus. Sie katalysieren die Spaltung der Peptidbindung.

Die meisten Proteasen im menschlichen Körper sind Verdauungsenzyme und damit im Magen-Darm-Trakt extrazellulär anzutreffen.

Daneben gibt es die intrazellulären Proteasen, die zu den Kathepsinen gehören. Sie sind in Organellen im Zytoplasma, den Lysosomen zu finden. Diese stellen eine Art Verdauungssystem der Zelle dar.

Die Proteasen lassen sich entsprechend ihrer Angriffsorte im Molekül einteilen in Exo- bzw. Endopeptidasen. Letztere spalten die Proteine an bestimmten Stellen in der Mitte der Kette. Trypsin, Chymotrypsin und Kathepsine sind Endopeptidasen oder auch Proteinasen. Exopeptidasen greifen die Proteine vom Ende der Kette her an.

Proteasen finden sich in den Lysosomen aller Zellen. Für unsere Arbeit sind vor allem die Proteinasen interessant, die in den Lysosomen der neutrophilen Granulozyten zu finden sind.

II. GRANULOZYTEN

Die neutrophilen Granulozyten stellen mit 60 - 70 % den überwiegenden Anteil an der Gesamt-Leukozytenzahl dar.

Die Granulozyten können entsprechend der Anfärbbarkeit ihrer Granula in neutrophile, basophile und eosinophile Zellen unterschieden werden. Sie werden als polymorphkernige Zellen (PMN) zusammengefaßt und den mononukleären Zellen gegenübergestellt (Lymphozyten, Monozyten).

1. Granula

Den Inhalt der Granula stellen saure Hydrolasen und proteolytische Enzyme dar. Neuere Forschungen haben sich die exaktere Beschreibung der Granula und ihres Inhalts zur Aufgabe gemacht.

Als erstes gelang es in neutrophilen Kaninchen PMN azurophile und spezifische Granula zu trennen (5, 6). Später waren ähnliche Versuche mit menschlichen PMN erfolgreich (4). Es gelang ebenfalls zwei verschiedene Populationen von Granula zu trennen, die hinsichtlich ihrer Enzymausstattung den azurophilen und spezifischen Granula der Kaninchen PMN sehr ähnlich sind.

BAGGIOLINI-BRETZ (2, 3) unterteilen den Inhalt der azurophilen Granula in saure Hydrolasen, die in den Vakuolen aller Zellen enthalten sind und in Granula-Proteine, die nicht so verbreitet sind. Sie sind mehr charakteristisch für die polymorphkernigen Leukozyten.

Die Granula-Proteine lassen sich unterteilen in bakterizide Stoffe und neutrale Proteasen. Zu ersteren gehören die Myeloperoxidase, Lysozym, sogenannte kationische Proteine, Lactoferrin und Pyridin-Nucleotid-Oxidase.

Zu den neutralen Proteasen werden Elastase und Kathepsin G gerechnet.

Die Arbeitsgruppe OHLSSON/OLSSON (42) unterscheiden ebenfalls azurophile und spezifische Granula. Sie bestätigen das Vorkommen von Elastase und den kationischen Proteinen, die auf Grund ihrer Ähnlichkeit mit Chymotrypsin den neutralen Proteasen nahestehen. Zusätzlich fanden sie neutrale Kollagenase in den azurophilen Granula. Dieses Ergebnis steht im Gegensatz zu den Analysen von MURPHY/REYNOLDS (35). Aus ihren Ergebnissen geht eindeutig hervor, daß die Kollagenase in den spezifischen Granula lokalisiert ist. Als weitere Enzymausstattung beinhalten sie Lactoferrin und Lysozym. Es konnten keine sauren Hydrolasen in ihnen nachgewiesen werden. Aus den Versuchsergebnissen von DEWALD/RINDLER-LUDWIG (11)

geht hervor, daß die Elastase die Hauptkomponente der neutralen Granula-Proteine ist.

Die Aufgabe der Granula sieht BAGGIOLINI (9) in der Speicherung der Enzyme.

Auf Grund ihres Inhalts spricht er bei den azurophilen Granula von einer Art "Haupt- oder Superlysosom", während er die spezifischen Granula wegen ihres Mangels an sauren Hydrolasen als "Nebenlysosom" bezeichnet.

Der Granula-Inhalt, die Enzyme, werden ihrer Bestimmung bei der Phagozytose zugeführt.

2. Phagozytose

Die Aufgabe der Granulozyten liegt in der Phagozytose, d.h. in der Eliminierung von Fremdsubstanzen, die in den Körper eingedrungen sind, oder in ihm gebildet wurden. Dabei wandern die Leukozyten zu dem Angriffsort und nehmen die Substanz durch Bildung einer phagozytären Vakuole in sich auf. Durch Vereinigung dieser Vakuole mit den Lysosomen können die Verdauungsenzyme die Fremdsubstanz (Bakterien, Gewebstrümmer, Staub) abbauen.

Zellteile, die funktionsuntüchtig geworden sind können durch Bildung autophagozytärer Vakuolen eliminiert werden.

III. BESCHREIBUNG DER NEUTRALEN GRANULOZYTEN-PROTEASEN

Wie unter II.1 ausgeführt, lassen sich eine Reihe von Enzymen in den azurophilen und spezifischen Granula unterscheiden. Da wir nur im neutralen pH-Bereich gearbeitet haben, wollen wir unser Hauptaugenmerk auf die neutralen Proteasen der menschlichen PMN legen.

1. Elastase

Proteolytische Aktivität in den Leukozyten ist schon lange bekannt (13, 33). Ein Zusammenhang zwischen Gefäßwandzerstörung und dem Einwirken von sauren Kathepsinen aus den Leukozyten-Lysosomen konnte in vitro nachgewiesen werden (10). Bedingung war ein signifikantes Absinken des pH, wobei die Frage offen blieb, ob in vivo ein derart niedriger Gewebs-pH erreicht werden konnte.

Neuere Untersuchungen zeigten nun auch bei neutralem pH Gefäßzerstörungen durch Leukozyten-Proteasen (27, 28). JANOFF/SCHERER gelang es mit PMN-Granula-Proteasen-Konzentration bei neutralem pH in vitro Gefäß-Basalmembran zu zerstören und in vivo durch Injektion der Konzentrate Hämorrhagien zu setzen.

In weitergehenden Versuchen (27) klärten sie, daß die Aktivität einem elastinolytischen Enzym zugerechnet werden muß, das eindeutig von einer Kollagenase zu trennen war, die ebenfalls in den Zellen lokalisiert ist.

OHLSSON/OLSSON (38) isolierten elastinolytische Enzyme aus Extrakt von menschlichen leukämischen Myeloidzellen. Auf Grund der unterschiedlichen elektrophoretisch-gemessenen Wanderungsgeschwindigkeiten konnten sie 3 Proteine unterscheiden. Das Molekulargewicht bestimmten sie zw. 33 000 und 36 000. Die 3 Elastasen waren im Aminosäuren-Aufbau gleich, bis auf den Gehalt an Arginin.

Die Elastase ist in der Lage Elastin, Bestandteil der elastischen Fasern der *Elastica interna* von Arterien und großen Venen abzubauen.

In vitro lag die maximale Aktivität bei pH 8,5 (23, 38), aber auch bei pH 6 - 7 konnten noch 50 % der Aktivität nachgewiesen werden (23).

Da das Färbeverhalten der *Elastica* nach Behandlung mit Elastase in vitro (27) dem entspricht, wie es bei akuten Entzündungen von Blutgefäßen beim Menschen vorkommt und auf Grund der anderen Ergebnisse vermutet man, daß die Elastase diese Veränderungen verursacht bzw. daran beteiligt ist.

Damit wäre man der Erklärung der Pathogenese der akuten Arteritis einen Schritt nähergekommen.

Weitergehende Versuche beschäftigen sich mit den Wirkungen von Elastase auf den Knorpel (22, 26, 29).

JANOFF/KEISER/GREENWALD (26) fanden, daß Elastase isolierte Proteoglykane aus Nasenknorpel von Rindern bei neutralem pH in vitro abbauen kann. Dabei wird ausschließlich die Proteinkomponente der Proteoglykane gespalten. Da der Aufbau des Rinderknorpels dem menschlichen sehr ähnelt, ist ein vergleichbares Ergebnis am menschlichen Knorpel wahrscheinlich.

Zur weiteren Charakterisierung markierten sie (29) Gelenksknorpel von Kaninchen mit $^{35}\text{SO}_4$ und inkubierten Stücken davon mit PMN-Elastase. Die folgende Freisetzung von $^{35}\text{SO}_4$ -enthaltenden Molekülen sehen sie als Index für die Auflösung von Chondroitin- bzw. Keratansulfat enthaltenden Peptiden an. Diese stammen aus Matrix-Proteoglykanen des Knorpels.

Daneben gelang ihnen der Nachweis über das Eindringen von Elastase in den Knorpel. Da ein Eindringen des Hauptinhibitors α_1 -AT nicht nachgewiesen werden konnte, kann man vermuten, daß die Leukozyten-Elastase bei der Entstehung von akuten entzündlichen Arthritiden und den folgenden Gewebsschädigungen beteiligt ist.

Nicht nur direktes Einwirken auf das Gewebe in der Folge von Entzündungen kennzeichnet das Verhalten der Elastase. Auch indirekt vermag sie den Entzündungsverlauf zu beeinflussen, da sie die Kinin-Freisetzung aus Plasmakininogenen induziert (24). Damit wäre sie für einige klassische Zeichen der Entzündung, wie gesteigerte Gefäßpermeabilität mit daraus resultierendem Ödem und Schmerzen verantwortlich.

Das breite Spektrum der pathologischen Wirkungen von Elastase zeigt sich auch in Versuchen von SENIOR/OHLSSON (53), durch Injektion von Elastase-Konzentration in die Atemwege von Hamstern Lungenemphyseme zu erzeugen. Als Vergleichslösung dient Pankreas-

Elastase, die ebenso wie PMN-Elastase in vitro Lungenelastin abzubauen vermag.

Sie stellten fest, daß sie mit PMN-Elastase vergleichsweise schwächer ausgeprägte Emphyseme hervorrufen konnten als mit Pankreas-Enzym. Es gelang ihnen auch mit höheren PMN-Elastase-Dosen nicht, schwere Emphyseme zu erzeugen, da die Tiere vor Ausbildung des Krankheitsbildes an schweren Hämorrhagien starben.

Als mögliche Erklärung könnte man einmal die direkte schädigende Wirkung der PMN-Elastase auf die Basalmembran kleinerer Gefäße annehmen oder indirekt, die Permeabilitätserhöhung der Gefäße durch die induzierte Kinin-Freisetzung dafür verantwortlich machen. In beiden Fällen käme es durch Blutaustritt zu Hämorrhagien und zugleich könnten die Serum-Inhibitoren in das Gewebe gelangen und eine weitere Elastolyse und damit Emphysembildung verhindern.

Möglicherweise spielt auch ein lokal gebildeter Bronchial-Inhibitor eine Rolle, der die Leukozyten-Elastase stärker hemmt, als die Pankreas-Elastase.

2. Kollagenase

LAZARUS (31) veröffentlichte als erster einen Bericht über die Entdeckung eines kollagenolytischen Enzyms aus menschlichen neutrophilen Granulozyten.

Grundlegende Untersuchungen zur biochemischen Charakterisierung dieses Enzyms führten OHLSSON/OLSSON (37) durch.

Sie trennten 2 Varianten eines kollagenolytischen Enzyms aus den Granula leukämischer Myeloidzellen mit Hilfe der Säulenchromatographie und der Elektrophorese. Die beiden Enzyme unterscheiden sich in der elektrophoretischen Wanderungsgeschwindigkeit, wobei eine unterschiedliche Anzahl der Carboxyl-Gruppen bei sonst gleichem Aufbau als Erklärung herangezogen wird.

Durch Dünnschicht-Chromatographie bestimmten sie das Molekulargewicht zu 76 000. Nach Behandlung mit Dodecylsulfat und anschließender Elektrophorese konnten sie 2 Komponenten trennen mit dem MG 33 000 bzw. 42 000, was vermuten läßt, daß die eigentlichen Enzyme aus je 2 Untereinheiten aufgebaut sind.

Die Kollagenasen zeigen ihre größte Aktivität bei annähernd physiologischem pH 7,6 (31), bzw. bei leicht alkalischem pH 8,0 - 8,5 (37). Bei diesem pH hydrolisierten beide Enzyme gelöstes Kollagen indem sie die Kollagen-Monomere in Fragmente von 1/4 und 3/4 Länge spalten, ohne daß deren helicale Konformation verloren geht. Die Spaltung von Fibrinogen und Proteoglykanen zeigt die mehr unspezifischen proteolytischen Eigenschaften.

3. Chymotrypsin-ähnliches Enzym

Geringe Mengen eines Chymotrypsin-ähnlichen Enzyms konnten GERBER/CARSON (12) aus menschlichen neutrophilen Leukozyten isolieren. Es ähnelt hinsichtlich der Substrat-Spezifität dem Pankreas alpha-Chymotrypsin. Das Enzym zeigt gegenüber einer Reihe von Chymotrypsin-Substraten, die einen Tyrosin-Rest besitzen hydrolytische Aktivität.

RINDLER/SCHMALZL gelang es die CT-ähnliche Aktivität neutrophiler Granulozyten den basischen Proteinen zuzuordnen. Die Aktivität beträgt ca. 1/30 der Elastase-Aktivität (gemessen durch die Hydrolyse von Azetyl-alanyl-alanyl-alanin-methylester) (50).

Mit Hilfe von Affinitätschromatographie auf 4-Phenylbutylamin-Sepharose trennten sie 3 kationische Proteine aus den Granula menschlicher PMN. Sie hydrolysieren Casein, Azocasein und das CT-Substrat N-acetyl-L-Tyrosinäthylester. Optimale Aktivität zeigt sich bei pH 7,4 - 7,5 (49).

Ähnlich wie die Elastase vermag eine Granulafraktion, die nur Chymotrypsin-ähnliches Enzym und Lysozym enthält, Moleküle mit radio-

aktivmarkiertem $^{35}\text{SO}_4$ aus entsprechend vorbereiteten Kaninchen-Ohr-Knorpel freizusetzen (26). Da Lysozym keinerlei Aktivität gegenüber Knorpel erkennen läßt, vermutet man eine hohe Aktivität von dem Chymotrypsin-ähnlichen Enzym. Auch Pankreas-alpha-CT löst bis herab zu einer Konzentration von $1\text{ }\mu\text{g/ml}$ die markierten $^{35}\text{SO}_4$ -Moleküle. So ist es wahrscheinlich, daß auch die CT-ähnlichen Esteroproteasen aus den menschlichen neutrophilen Granulozyten eine entscheidende Rolle bei akuten Gelenkserkrankungen spielen.

4. Fibrinolytische Enzyme

Der Abbau von Fibrin durch Enzyme aus menschlichen neutrophilen Granulozyten wurde von BARNHART (7) beschrieben.

PROKOPOWICZ (46) zeigt 3 neutrale Proteasen mit fibrinolytischer Aktivität in den gleichen Zellen.

Ein Enzym zeigte spontane fibrinolytische Aktivität, die durch Entfernen eines Inhibitors aus dem Leukozyten-Homogenisat noch gesteigert werden konnte.

Das zweite Enzym lag in einer inaktiven Form vor und scheint mit dem Profibrinolysin des Plasmas identisch zu sein (47).

Der dritte Faktor aktiviert vermutlich Plasminogen.

IV. INHIBITOREN

Tritt infolge von Verletzungen, Verbrennungen oder Infektionen ein Zerfall von Granulozyten ein, werden diese Enzyme freigesetzt und könnten ihre Aktivität gegen das umliegende Gewebe richten. Als Schutz dagegen gibt es im Körper Inhibitoren, deren Aufgabe in der Abgrenzung von Entzündungsprozessen gegen das gesunde Gewebe und der Verhinderung von unkontrolliertem Gewebsabbau liegt. Es lassen sich neben Serum-Inhibitoren, die im Körper zirkulieren noch spezifische Gewebs-Inhibitoren nennen.

1. Serum-Inhibitoren

Das α_1 -Antitrypsin (α_1 -AT) ist ein α_1 -Globulin des Serums mit einem Molekulargewicht von 45 000 und gilt als der wichtigste Trypsin-Inhibitor. Er vermag Trypsin, Chymotrypsin, Elastase, Kollagenase und - was hier von besonderer Bedeutung ist - Proteasen aus Leukozyten und bestimmten Bakterien zu hemmen.

Daneben kommen im Serum noch die Inhibitoren α_2 -Makroglobulin, α_1 -Chymotrypsin und Intertrypsin-Inhibitor vor.

OHLSSON/OLSSON untersuchten die Reaktionen zwischen α_1 -AT bzw. α_2 -Makroglobulin und der Granulozyten-Elastase (39, 36). Durch Komplexbildung zwischen den Serum-Inhibitoren und der Elastase kommt es zur Hemmung des Enzyms. Das molare Bindungsverhältnis beträgt 1:1 bei Elastase: α_1 -AT und 2:1 bei Elastase: α_2 -MG. Die Affinität der Elastase ist zu beiden Inhibitoren annähernd gleich. Da die molare Konzentration von α_1 -AT im normalen menschlichen Serum ca. 5 - 10 mal höher liegt, als die von α_2 -MG, kann α_1 -AT als Hauptinhibitor der Granulozyten-Elastase angesehen werden.

Neuere Untersuchungen dieser Arbeitsgruppe (40) beschäftigen sich mit den Reaktionen zwischen Granulozyten-Kollagenase und α_1 -AT bzw. α_2 -MG. In vitro fanden sie ein molares Bindungsverhältnis von 1:1 bei Kollagenase/ α_1 -AT und ebenfalls ein Verhältnis von 1:1 bei Kollagenase/ α_2 -MG.

Die Affinität der Granulozyten-Kollagenase zu α_2 -MG ist etwa 10 mal stärker als zu α_1 -AT. Da aber die Konzentration von α_1 -AT entsprechend höher ist, können beide Inhibitoren als gleichwertig für die Inaktivierung der Granulozyten-Kollagenase angesehen werden.

2. Gewebsinhibitoren

Neben den im Körper zirkulierenden Serum-Inhibitoren lassen sich aus einigen Geweben bzw. deren Sekreten speziellere Inhibitoren isolieren.

Dem Labor HOCHSTRASSER (16, 19, 48) gelang der Nachweis von 2 Proteasen-Inhibitoren aus den Schleimhäuten des Respirationstrakts. Sowohl aus Nasensekret als auch aus Bronchialsekret konnte ein säurestabiler Hemmstoff isoliert werden, der ein MG von 15 000 aufweist und Trypsin, Chymotrypsin sowie leukozytäre Proteasen hemmt. Ein zweiter säurestabiler Hemmstoff wurde aus Bronchialsekret (18) isoliert. Er hat ein MG von 20 000 und hemmt ebenfalls Trypsin, Chymotrypsin und Leukozyten-Proteasen.

Die beiden Inhibitoren bewirken etwa 70 % der gesamten Hemm-Kapazität des Bronchialsekrets. Den Rest macht α_1 -AT aus.

Die Forschergruppe OHLSSON/TEGNER (43) isolierten ebenfalls einen säurestabilen Proteasen-Inhibitor aus menschlichem Bronchialsekret. Sie bestimmten das MG zu 14 000. Er hemmt Granulozyten-Elastase vollständig durch Komplex-Bildung. Das Verhältnis beträgt dabei 1 : 1. Granulozyten-Kollagenase wird nicht inaktiviert.

Eine neuere Versuchsreihe dieser Arbeitsgemeinschaft (44) entdeckte einen weiteren säurestabilen Inhibitor aus menschlichem Bronchialsekret. Das MG beträgt 10 500. Er konnte im Flimmerepithel der Trachea und des Sinus maxillaris nachgewiesen werden (55).

Zwar unterscheiden sich die Methoden der Aufbereitung des Sekrets in den beiden Labors, aber da die inhibitorischen Eigenschaften im wesentlichen übereinstimmen, handelt es sich wahrscheinlich um die gleichen Inhibitoren.

Nicht nur die Granulozyten-Elastase wird von dem niedermolekularen säurestabilen Inhibitor des Bronchialsekrets gehemmt, auch die chymotrypsin-ähnlichen kationischen Granula-Proteine der menschlichen PMN bilden mit dem Inhibitor einen Komplex, wobei das molare Bindungsverhältnis 1 : 1 beträgt (56).

3. Inhibitoren anderer natürlicher Herkunft

Weitere Proteasen-Inhibitoren tierischer, pflanzlicher und mikrobieller Herkunft wurden von SCHIESSLER/OHLSSON (51) untersucht.

Als sehr wirkungsvoll gegenüber der esterolytischen Aktivität der Granulozyten-Elastase vom Mensch erwiesen sich die Trypsin-Chymotrypsin-Inhibitoren aus der Glandula submandibularis von Hunden, aus Sojabohnen und aus Kichererbsen.

Elastatinal, ein aus Aktinomyzeten (*Streptomyces griseoruber*) gewonnenes Peptid mit spezifischer Hemmwirkung gegen Elastase bildet stabile Komplexe mit Elastase aus Granulozyten vom Mensch.

Eine mögliche therapeutische Anwendung dieser Inhibitoren bei bestimmten pathologischen Zuständen zur Hemmung der destruktiven Wirkung der Granulozyten-Proteasen gegen Bindegewebsstrukturen wird diskutiert.

Einen weiteren Inhibitor tierischer Herkunft entdeckten SEEMÜLLER/MEIER (52). Sie isolierten aus dem Blutegel (*Hirudo medicinalis*) durch Gelfiltration und Ionenaustausch-Chromatographie zwei Protease-Inhibitoren, die Chymotrypsin, Subtilisin und die PMN-Proteasen Elastase und Kathepsin G hemmen.

Als Bezeichnung für die Inhibitoren wählten sie den Ausdruck "Egline".

Sie sind in neutraler und schwach saurer (pH 3) Lösung sehr stabil und gegenüber unspezifischer Proteolyse unempfindlich.

Das Molekulargewicht der Egline wird mit 6 600 - 6 800 angegeben.

4. Synthetische Inhibitoren

Für exakte Versuche mit der Granulozyten-Elastase ist es notwendig, Inhibitoren zur Verfügung zu haben, die ausschließlich dieses Enzym inaktivieren ohne andere Enzyme zu beeinflussen.

TUHY/POWERS (58) fanden in Chlormethylketonen hochspezifische Inhibitoren.

Als Inaktivator für Elastase aus menschlichen Granulozyten synthetisierten sie Carbobenzoxy-L-glycyl-L-leucyl-L-alanin Chlormethylketon (CBZ-Gly-LEU-Ala-CMK).

Das chymotrypsin-ähnliche Enzym inaktivierten sie mit Carbobenzoxy-L-glycyl-L-leucyl-L-phenyl-alanin Chlormethylketon (CBZ-gly-leu-phe-ala-CMK).

Als weitere Chlormethylketone synthetisierten TUHY und POWERS (45) N-Acetyl-L-alanyl-L-alanyl-L-alanin Chlormethylketon (AAACK) und N-Acetyl-L-alanyl-L-alanyl-L-prolyl-L-alanyl Chlormethylketon (AAPACK).

Auch diese beiden Chlormethylketone hemmen ausschließlich die Granulozyten-Elastase.

Zu erwähnen ist noch, daß Gold-thiomalat, das bei der Behandlung von rheumatoider Arthritis herangezogen wird, die esterolytische Aktivität der Elastase gegen synthetische Substrate hemmt (21).

V. PHYSIOLOGISCHE ROLLE DER ELASTASE

Mit Hilfe spezifischer Elastase-Inhibitoren ist es möglich, der Klärung der physiologischen Rolle dieses Enzyms in den Leukozyten einen Schritt näher zu kommen.

Erste Versuche in dieser Richtung unternahmen JANOFF und BLONDIN (24) mit Hilfe autoklavierter, also abgetöteter Bakterien (*Staphylococcus aureus* und *Micrococcus roseus*). Sie inkubierten Bakterien-Suspensionen mit verschiedenen Proteasen, u. a. auch mit Leukozyten-Granula-Protein. Durch photometrische Messungen konnten sie einen Abbau der Bakterien-Proteine feststellen. Zur exakten Bestimmung des verantwortlichen Enzyms innerhalb der Granula-Proteine inkubierten sie die Bakterien mit dem spezifischen Elastase-Inhibitor AAACK. Daraufhin konnte kein Abbau der Bakterien-Proteine durch

Leukoproteasen gemessen werden. Der Trypsin-Inhibitor Tosyl-lysine Chloromethylketon beeinflusste den Abbau durch Granula-Proteine nicht.

Weitere Versuche in dieser Richtung unternahmen OLIVER/THORNE (57). Sie fanden, daß die Granulozyten-Elastase möglicherweise die Außenmembran der Bakterien *Acinetobacter* 199 A und *Staphylococcus aureus* insoweit permeabel macht, daß dann Lysozym die nachfolgende Lyse der Bakterien bewirken kann.

JANOFF und BLONDIN (25) können auch in neueren Versuchen die Wirksamkeit der Elastase bei dem Abbau von Bakterien-Protein bestätigen.

Sie kultivierten *E. coli* in Gegenwart von ^3H -Arginin und inkubierten sie dann mit wasserlöslichen Granula-Extrakten. Bei verschiedenen pH-Werten wurde schließlich die Freisetzung von markierten Peptiden gemessen. Am niedrigsten war sie bei pH 3 während sie bei pH 7,6 signifikant anstieg. Sobald der Granula-Extrakt mit den spezifischen Inhibitoren AAACK bzw. AAPACK versetzt war, wurde die Freisetzung zu 82 % bzw. 96 % gehemmt. Daraus läßt sich folgern, daß einmal die Elastase den überwiegenden Anteil an den abbauenden Enzymen hat, daß aber auch zum andern noch weitere Enzyme am Abbau beteiligt sind.

Bei den bis jetzt beschriebenen Versuchen wurde immer mit Granula-Extrakten aus abgetöteten Leukozyten gearbeitet.

BLONDIN und JANOFF (8) gelang es nun auch mit lebenden Leukozyten Versuche zur Klärung der physiologischen Rolle der Elastase zu machen.

Notwendig dabei ist, daß der verwendete Inhibitor die Phagozytose-Tätigkeit der Zellen nicht beeinflusst, daß er lipidlöslich ist und eine irreversible Bindung mit dem Enzym eingeht. Dies ist bei CBZ-gly-leu-ala CMK der Fall.

Wieder wurden *E. coli* mit ^3H -Arginin markiert. Als Kontrollversuch wurden die Bakterien nur mit Methanol und den Granulozyten behan-

delt, um zu zeigen, daß die Chemotaxis, die Phagozytose und die Degranulation unbeeinflusst bleiben.

Als Maß der Verdauung von Bakterien-Proteinen dient die Freisetzung von radioaktiv markierten Isotopen, die in Trichloressigsäure löslich sind.

Werden die Bakterien mit in Methanol gelöstem Inaktivator inkubiert, geht die Freisetzung der Radioaktivität signifikant zurück. Das läßt darauf schließen, daß die Elastase einen erheblichen Anteil an dem Abbau des Bakterien-Proteins hat, was mit den vorherigen Versuchen übereinstimmt.

Die inkomplette Hemmung des Proteinabbaus geht wahrscheinlich auf die Beteiligung anderer leukozyitärer Proteasen, wie Kollagenase oder das chymotrypsin-ähnliche Enzym zurück.

VI. SYNTHETISCHE ELASTASE-SUBSTRATE

Mit synthetischen Substraten wird gearbeitet, um genauere Analysen und Messungen zur weiteren Charakterisierung der PMN-Elastase durchführen zu können.

Proteinsubstrate, wie z.B. orceingefärbtes Elastin zeigen zwar eine hohe Spezifität gegenüber Elastase - nur Pankreas- bzw. PMN-Elastase können es hydrolysieren - aber die Empfindlichkeit gegenüber den Enzymen ist sehr gering. Große Mengen des Enzyms und eine lange Versuchsdauer sind notwendig, um zu Ergebnissen zu kommen. Außerdem ist Orcein-Elastin nicht wasserlöslich.

Azocasein ist zwar 4 mal empfindlicher als Orcein-Elastin, aber die Spezifität ist nicht so hoch. Verschiedene Endopeptidasen wie Trypsin, Chymotrypsin, Acrosin und Subtilisin hydrolysieren es. Damit ist auch Azocasein für exakte Untersuchungen nicht geeignet.

Ein besseres synthetisches Substrat ist tertiärer Butyloxycarbonyl-alanin-p-nitrophenylester (Boc-Ala-ONp), da mit ihm noch 1 μ g Elastase bestimmt werden kann (41). Da es aber auch von Trypsin

und Chymotrypsin hydrolisiert wird und außerdem nicht wasserlöslich ist, ist es ebenfalls kein optimales Substrat.

Als zur Zeit bestes synthetisches Substrat sehen OHLSSON/OLSSON (41) 3-Carboxypropionyl-L-alanyl-L-alanyl-L-alanin-p-nitroanilid (Suc-Ala₃-NHNP) an. Es ist ähnlich empfindlich wie Boc-Ala-ONp, die Spezifität für PMN-Elastase ist stark ausgeprägt, es ist in neutralen Pufferlösungen löslich und eine spontane Hydrolyse bei neutralem oder leicht basischem pH ist gering.

C ERGEBNISSE

I. GEWINNUNG VON LEUKOZYTEN-PROTEASEN AUS MENSCHLICHEN BLUTKONSERVEN

Es gelang uns proteolytische Aktivität aus menschlichen Leukozyten durch Zentrifugieren von Blutkonserven, anschließender Dialyse und Lyophilisieren des Extraktes zu gewinnen.

Die relative Aktivität der Proteasen ermittelten wir mit Hilfe des Azocasein-Tests (s. Experimenteller Teil I, 2).

Zur Durchführung von Blindversuchen war es notwendig, die Proteasen zu inaktivieren. Das gelang durch 2-stündiges Inkubieren des dialysierten Leukozyten-Konzentrats bei 60°C (s. Eichkurve S. 26).

Als Vergleichsprotease diente uns das handelsübliche Präparat Papain der Fa. Merck. Die Inaktivierung erfolgte durch Blockierung der SH-Gruppen mit Jodessigsäure (60).

Entsprechende Mengen wirkungsgleicher Aktivität der Leuko-Proteasen und des Papains wurden in physiol. Kochsalzlösung gelöst und Laborratten ins Mittelohr appliziert. Zur Reaktivierung der Ergebnisse wurden die inaktivierten Enzyme ins jeweils andere Mittelohr gespritzt.

Nach verschiedenen Zeiträumen wurden die Tiere getötet und die Mittelohren nach den üblichen Methoden zu histologischen Präparaten verarbeitet.

II. VERÄNDERUNGEN DER MITTELOHRSCHEIMHAUT VON LABORRATTEN NACH EINBRINGEN VON AKTIVEN PROTEASEN

1. Leukozyten-Proteasen

a) nach 1-maliger Applikation

Der Schleimhautüberzug der Pauke zeigt mit flachem, einschichtigem Epithel, das stellenweise leicht kubisch ist, ein normales Bild. Um das tympanale Tubenostium sind einige cilientragende Zellen zu sehen. Trommelfell und Gehörknöchelchen erscheinen lichtmikroskopisch ohne auffälligen Befund (Abb. 1).

b) nach 3-maliger Applikation

Die Submucosa der Mittelohr-Schleimhaut erscheint gefäßreich, die Kapillaren sind weitgestellt und prall mit Erythrozyten gefüllt. Das Bindegewebe ist ödematös durchtränkt. Stellenweise hat das Epithel der Pauke kubische bis zylindrische Form angenommen (Abb. 2). Das Trommelfell zeigt in den meisten Fällen normales, endothelartiges Plattenepithel. Die, die Gehörknöchelchen umgebende Schleimhaut ist ebenso, wie die Paukenhöhlenauskleidung hyperämisch und ödematös gequollen. Das Epithel des Tubenostiums ist höher und mehrschichtig. Neben cilientragenden Zellen sind auch Becher-Zellen zu erkennen (Abb. 3).

c) nach 5-maliger Applikation

Zu der Hyperämie und ödematösen Durchtränkung tritt jetzt eine zellige Infiltration der Schleimhaut, bei der Lymphozyten und Plasmazellen überwiegen. Daneben sind auch Granulozyten und Makrophagen zu sehen, die die Submucosa und teilweise auch das Epithel durchsetzen (Abb. 10). In der Nische des runden Fensters ist das Epithel kubisch bis zylindrisch und teilweise mit Cilien besetzt. Vereinzelt

lassen sich dort Becherzellen beobachten (Abb. 4). In 2 Fällen ist die Submucosa des Trommelfells ödematös gequollen und von einigen Leukozyten und Fibrozyten durchsetzt (Abb. 5). Die Zahl der Becherzellen um das tympanale Tubenostium hat sich vergrößert, die Ausbreitung erfolgt weiter in Richtung Promontorium. In 1 Fall sind in direkter Nähe des Trommelfells cilientragende Zellen neben Zellen mit Sekretgranula zu beobachten. Die Gehörknöchelchen zeigen keine lichtmikroskopisch erkennbaren Veränderungen. Die sie umgebende Schleimhaut entspricht der übrigen Paukenauskleidung. In 2 Fällen ist die Pauke mit einem von Leukozyten durchsetzten hämorrhagischen Erguß angefüllt.

2. Pflanzliche Protease Papain

a) nach 1-maliger Applikation

Die Paukenschleimhaut erscheint normal flach, ohne Zeichen einer entzündlichen Veränderung. Das Trommelfell und die Gehörknöchelchen sind ohne auffälligen Befund. Das Epithel des Tubenostiums ist mehr kubisch bis prismatisch, vereinzelt mit Cilien besetzt.

b) nach 3-maliger Applikation

Das Epithel der Mittelohrschleimhaut nimmt einen mehr kubisch bis zylindrischen Charakter an. Die Einzelzellen erscheinen gequollen, der Zellverband aufgelöst. In der Submucosa liegen weite, prall mit Erythrozyten gefüllte Kapillaren (Abb. 6). Die Submucosa des Trommelfells ist ebenfalls hyperämisch und ödematös verdickt.

c) nach 5-maliger Applikation

In der Paukenhöhlen-Schleimhaut, die kubisches bis hochprismatisches Epithel zeigt, sind zahlreiche Rundzell-Infiltrate nachzuweisen. Die Paukenhöhle ist in 1 Fall mit einem hämorrhagisch-eitrigen Erguß angefüllt (Abb. 7, 8). Das Trommelfell ist zellig-infiltriert. Um

das tympanale Tubenostium läßt das mehrschichtige Epithel zahlreiche sekret-bildende nicht-cilientragende Zellen erkennen. Daneben sind aber auch Flimmerepithel-Zellen zu sehen. In der Nische des runden Fensters ist das Epithel hochprismatisch bis zylindrisch. Auch hier sind neben cilientragenden Zellen Becherzellen zu erkennen (Abb. 9). Der Schleimhaut-Überzug der Gehörknöchelchen entspricht dem Bild der übrigen Auskleidung der Paukenhöhle.

III. VERÄNDERUNGEN AN DER MITTELOHRSCHEIMHAUT VON LABORRATTEN NACH APPLIKATION VON INAKTIVEN PROTEASEN

1. inaktivierte Leukozyten

Die Schleimhaut-Veränderungen der Paukenhöhle entsprechen im wesentlichen denen, die nach Applikation von aktiven Enzymen auftreten. Lediglich nach 5-maliger Applikation ist eine geringere Zellinfiltration zu beobachten. Auch die Befunde am Trommelfell und den Gehörknöchelchen differieren nur wenig von denen, die unter II, 1 beschrieben sind. Allerdings konnte in keinem Fall ein Erguß beobachtet werden.

2. inaktiviertes Papain

Die Mittelohrschleimhaut weist nach Behandlung mit inaktivem Papain schwächer ausgeprägte Zeichen der Entzündung auf, als nach Behandlung mit aktivem Enzym. Das Trommelfell und die Gehörknöchelchen zeigen im wesentlichen die gleichen Befunde, wie die unter II, 2 beschriebenen. In keinem Fall war die Paukenhöhle von einem Erguß angefüllt.

D DISKUSSION

Zur abschließenden Klärung der Frage, ob die epithelialen Veränderungen an der Mittelohr-Schleimhaut, d.h. das Auftreten kubischen Epithels, Flimmerepithels und Becherzellen, Zeichen einer Entzündung sind oder zur normalen Paukenhöhlen-Auskleidung gehören ist es notwendig eine genaue Kenntnis über die normalen Schleimhautverhältnisse des Mittelohrs zu haben. In den letzten Jahren ist eine Reihe von Veröffentlichungen erschienen, die sich mit diesem Thema befassen. In unserem Fall möchte ich mich auf die Versuchsergebnisse beschränken, die beim Meerschweinchen erhalten worden sind, da diese Tiere zu den bei uns verwendeten Laborratten relativ nahe verwandt sind.

LIM (32) untersuchte elektronenmikroskopisch u.a. die Region des tympanalen Tubenostiums beim Meerschweinchen. Er fand schleimproduzierendes Epithel durchsetzt mit Becherzellen und Zellen mit dunklen Sekretgranula, die insbesondere in der Übergangszone zwischen der Tubenmündung und dem Hypotympanon zu finden waren. Ebenfalls in der Umgebung des Tubenostiums konnten sie mehrreihiges flimmerndes Zylinderepithel zeigen (20). Es verliert in zunehmendem Abstand von der Tubenöffnung an Höhe, bis es schließlich aus flachen, endothelartigen Zellen besteht. Gruppen einzelner kubischer oder zylindrischer z.T. cilientragender Epithelzellen sind eingestreut. Becherzellen treten in großer Zahl in der Nähe des Tubenostiums auf, in zunehmendem Abstand davon werden sie seltener.

ZECHNER (60) sieht im Auftreten von Becherzellen und Flimmerepithel, ausgenommen um die Tubenöffnung, eine Metaplasie des Epithels nach Entzündung. ARNOLD-VOSTEEN (1) gehen davon aus, daß die unbelastete Mittelohrschleimhaut mit Ausnahme des Tubenwinkels ein flaches, cilienloses und schleimdrüsenloses Epithel aufweist. Entsprechend diesen Veröffentlichungen wäre das Auftreten von kubi-

schen, cilientragenden Zellen, sowie von Becherzellen außerhalb der Umgebung des tympanalen Tubenostiums eine Metaplasie des Schleimhautepithels der Paukenhöhle als Folge eines Entzündungsreizes. Andererseits ist es auch möglich, daß das Epithel der Tube mit cilientragenden Zellen und Becherzellen in das Mittelohr vordringt, ohne daß es zu einer regelrechten Metaplasie der Zellen der Mittelohrschleimhaut kommt.

Inwieweit in unseren Befunden die eingebrachten Proteasen oder die mit Leukozyten durchsetzten Ergüsse als Entzündungsreiz gewirkt haben, ist schwer zu trennen. In den mit inaktiven Proteasen behandelten Paukenhöhlen konnte jedenfalls kein Erguß gesehen werden, und die entzündlichen Erscheinungen waren schwächer ausgeprägt. Es wäre möglich, daß die beim Granulozytenzerfall freiwerdenden lysosomalen Enzyme einen zusätzlichen Reiz auf die Schleimhaut ausüben. GRÜNBERG (14) machte ähnliche Beobachtungen. Auch er behandelte Mittelohren, allerdings von Hunden, mit einer aktiven Protease und injizierte zum Vergleich physiologische Kochsalzlösung in das andere Ohr. In beiden fand sich nach verschiedenen zeitlichen Intervallen eine Otitis media. Die entzündlichen Veränderungen waren in dem der aktiven Protease ausgesetztem Mittelohr stärker ausgeprägt, als die, der mit NaCl behandelten Seite.

Die Tatsache, daß die bei chronischen Eiterungen aus Leukozyten-Zerfall freiwerdenden Enzyme eine erhebliche Wirkung zeigen, hat GÜNNEL (15) beschrieben. Er fand bei chron. Felsenbeineiterungen Zerstörungen an den Ossicula.

Die relativ geringeren Veränderungen in unseren Präparaten werden einmal auf die vergleichsweise geringe Aktivität der eingesetzten Enzyme zurückzuführen sein, zum anderen mag auch die Einwirkungszeit von max. 5 Tagen zu gering bemessen gewesen sein, um gravierendere Ergebnisse zu erhalten.

E EXPERIMENTELLER TEIL

I. VERSUCHSANORDNUNG

In Parallelversuchen werden Lösungen der pflanzlichen Protease Papain und Leukozyten-Extrakte mehreren Ratten ein- oder mehrmals durchs Trommelfell in die Paukenhöhle gespritzt. In das andere Mittelohr werden Vergleichslösungen der selben Konzentration, aber mit inaktiven Enzymen eingebracht. Die Ratten werden jeweils mit 1, 5 ml Chloralhydrat narkotisiert und bekommen zur antibiotischen Abdeckung bei jeder Injektion 300 000 I.E. Megacillin. Nach verschiedenen zeitlichen Intervallen (s. Tabelle) werden die Tiere durch Äther getötet, die Felsenbeine herausoperiert und zur Fixierung in 10 %ige Formalinlösung gelegt. Die Herstellung der histologischen Präparate erfolgt nach den üblichen Methoden. Als Färbung wird Hämatoxylin-Eosin gewählt.

1. Gewinnung der Leukozyten-Proteasen

Citrat-Blut wird 15 min bei 4500 U/min zentrifugiert, die dünne Leukozyten-Schicht auf der Erythrozyten-Säule wird durch vorsichtiges Absaugen gewonnen, und mit physiologischer Kochsalzlösung gewaschen. Die flüssige Phase wird jeweils verworfen. Dann wird der Leukozyten-Extrakt mit aqua dest versetzt und 15 min homogenisiert. Dieser 1. Ansatz wird zentrifugiert und mittels der Azocaseinmethode (s. unten) auf proteolytische Aktivität getestet. Bei genügend hoher Aktivität wird die flüssige Phase abpipettiert, und die Zelltrümmer werden erneut mit aqua dest. zum 2. Ansatz aufgeschwemmt. Erweist sich die Aktivität des 1. Ansatzes als zu niedrig, wird er einige Tage bei 7°C aufbewahrt und danach erneut getestet.

Dieses Verfahren wird solange durchgeführt, bis die Zelltrümmer keine proteolytische Aktivität mehr freisetzen.

Die zentrifugierten Ansätze werden entweder sofort fraktioniert, oder sie werden gesammelt, zur Aufbewahrung eingefroren und bei gegebener Zeit aufgetaut und zusammen auf eine Säule gegeben. Die Fraktionierung erfolgt durch Gelfiltration auf einer Sephadex-Säule G-100 von 100 x 5 cm, 0,05 M Boratpuffer, pH 8,0 enthaltend 0,1 M NaCl (200 mg Trockensubstanz in 40 ml Puffer). Damit gelingt eine vollständige Abtrennung von Hämoglobin. Die proteasehaltigen Fraktionen werden mittels der Azocaseinmethode identifiziert (s. unten), vereinigt, dialysiert und lyophilisiert.

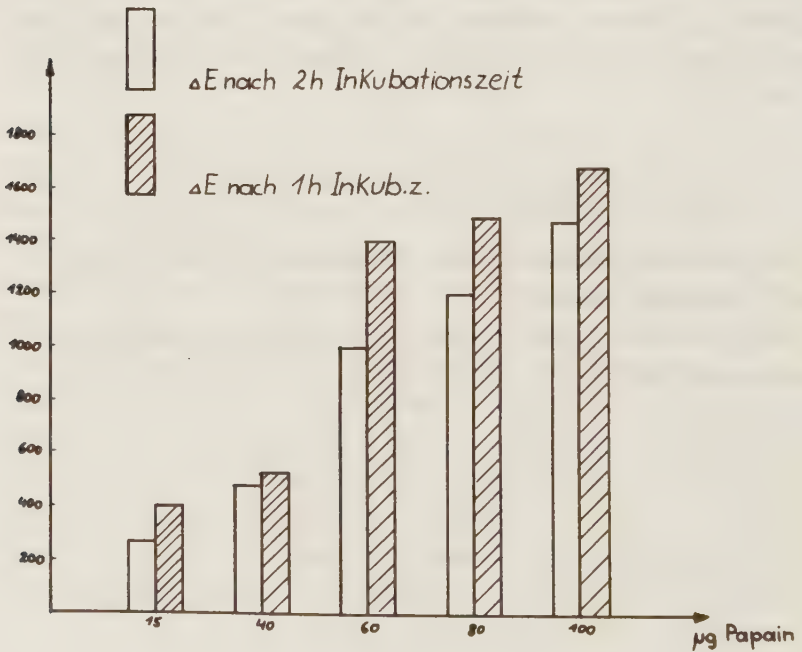
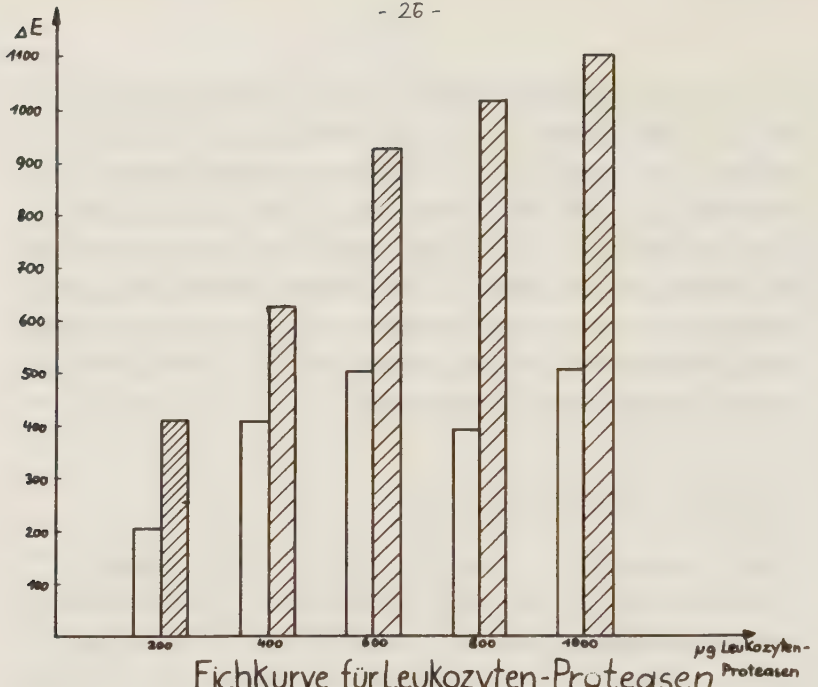
2. Aktivitätsbestimmung

0,1 ml proteasehaltige Lösung, 0,4 ml 0,2 M Triäthanolamin x x HCl-Puffer pH 7,8, 1 ml 2 %ige Azocaseinlösung im gleichen Puffer werden zusammengegeben und 1 h bei 37°C inkubiert. Die Fällung erfolgt mit 5 %iger Trichloressigsäure, die Extinktion wird bei 405 nm gegen den Leerwert gemessen. Mit Hilfe einer Eichkurve lassen sich wirkungsgleiche Mengen von Papain und Leukozyten-Proteasen ermitteln.

3. Inaktivierung

Die Leukozyten-Proteasen können durch 2 stündiges Inkubieren bei 60°C inaktiviert werden.

Papain wird durch Blockierung der SH-Gruppen mit Jodessigsäure inaktiviert (54).



II. VERSUCHSDURCHFÜHRUNG

5,5 l Citrat-Blut werden nach der o.g. Methode verarbeitet. Zur Testung werden 0,5 ml der zentrifugierten Ansätze bzw. der Fraktionen genommen. Als Leerwert wird bei den Fraktionen der Borat-Puffer herangezogen.

1. Ansatz DE = 435

Der 1. Ansatz wird auf die Säule gegeben, ein 2. Ansatz wird hergestellt.

Fraktion	Extinktion
2	235
5	258
8	235
10	270
13	620
16	732
19	485
22	352
25	346
28	336
31	331

Die Fraktionen 9 - 31 werden dialysiert und lyophilisiert.

2. Ansatz nach 2 Tagen DE = 660

Der 2. Ansatz wird auf die Säule gegeben. Ein 3. Ansatz wird hergestellt.

Fraktion	Extinktion
13	480
15	286
18	386
21	291
24	266
27	277

Fraktion	Extinktion
30	260
33	265
36	265
39	230
42	200

Die Fraktionen 15 - 36 werden dialysiert und lyophilisiert.

3. Ansatz nach 2 Tagen DE = 110

3. Ansatz nach 4 Tagen DE = 105

Der 3. Ansatz wird verworfen.

5,5 l Citrat-Blut werden nach der o.g. Methode verarbeitet.

1. Ansatz DE = 570

Der 1. Ansatz wird auf die Säule gegeben, ein 2. Ansatz wird hergestellt.

Fraktion	Extinktion
61	421
65	370
68	404
70	480
71	390
74	505
77	571
80	530
83	490
86	400
89	415
92	390

Die Fraktionen 68 - 90 werden dialysiert und lyophilisiert.

2. Ansatz nach 2 Tagen DE = 220

2. Ansatz nach 4 Tagen DE = 430

Der 2. Ansatz wird auf die Säule gegeben, ein 3. Ansatz wird hergestellt.

Fraktion	Extinktion
10	195
20	175
30	180
35	185
38	236
41	410
44	435
47	397
49	345
52	220
57	177
62	179
67	176
72	190
78	190

Die Fraktionen 38 - 57 werden dialysiert und lyophilisiert.

3. Ansatz nach 2 Tagen DE = 113

3. Ansatz nach 4 Tagen DE = 87

Der 3. Ansatz wird verworfen.

Weitere 4,5 l Citrat-Blut werden nach der o. g. Methode verarbeitet.

1. Ansatz DE = 320

Der 1. Ansatz wird auf die Säule gegeben, ein 2. Ansatz wird hergestellt.

Fraktion	Extinktion
1	520
5	137
10	131
13	130
15	130
18	152
21	166

Fraktion	Extinktion
24	167
27	167
30	161
33	126
36	135
39	155
42	137
45	141
46	143
51	150
56	157
61	135
66	127
71	130
76	124
80	120

Die Fraktionen 15 - 44 werden dialysiert und lyophilisiert.

2. Ansatz nach 5 Tagen DE = 442 wird eingefroren

3. Ansatz nach 1 Tag DE = 995 wird eingefroren

4. Ansatz nach 1 Tag DE = 260

Die Ansätze 2 und 3 werden aufgetaut und zusammen mit Ansatz 4 auf die Säule gegeben.

Fraktion	Extinktion
2	850
12	810
22	820
25	820
26	841
29	730
32	983
35	986
38	1415

Fraktion	Extinktion
41	1015
46	935
51	950
54	970
58	965
62	945

Die Fraktionen 26 - 55 werden dialysiert und lyophilisiert.

5, 5 l Citrat-Blut werden nach der o.g. Methode verarbeitet.

1. Ansatz	DE = 501	wird eingefroren
2. Ansatz nach 2 Tagen	DE = 612	" "
3. Ansatz nach 1 Tag	DE = 217	
3. Ansatz nach 3 Tagen	DE = 308	" "
4. Ansatz nach 2 Tagen	DE = 156	wird verworfen

Die 3 Ansätze werden aufgetaut und auf die Säule gegeben.

Fraktion	Extinktion
2	325
12	360
15	331
18	555
21	710
24	1017
27	1065
30	885
33	820
36	545
40	445

Die Fraktionen 17 - 37 werden dialysiert und lyophilisiert.

4 l Citrat-Blut werden nach der o.g. Methode verarbeitet.

1. Ansatz	DE = 260	
1. Ansatz nach 2 Tagen	DE = 420	wird eingefroren

- 2. Ansatz nach 2 Tagen DE = 172
- 2. Ansatz nach 4 Tagen DE = 354 wird eingefroren
- 3. Ansatz nach 2 Tage DE = 85
- 3. Ansatz nach 4 Tagen DE = 205
- 3. Ansatz nach 6 Tagen DE = 200 verworfen

5, 5 1 Citrat-Blut werden nach o. g. Methode verarbeitet.

- 1. Ansatz DE = 35
- 1. Ansatz nach 2 Tagen DE = 355 wird eingefroren
- 2. Ansatz nach 2 Tagen DE = 414 wird eingefroren
- 3. Ansatz nach 2 Tagen DE = 464 wird eingefroren
- 4. Ansatz nach 2 Tagen DE = 85
- 4. Ansatz nach 3 Tagen DE = 162
- 4. Ansatz nach 5 Tagen DE = 265

Die jeweils 1. Ansätze der 4 bzw. 5, 5 1 Citrat-Blut werden zusammen fraktioniert.

Fraktion	Extinktion
2	1267
5	1452
8	1590
11	1634
14	1358
17	1279

Die Fraktionen 3 - 16 werden dialysiert und lyophilisiert.

Die 2. Ansätze der verarbeiteten 4 bzw. 5, 5 1 Citrat-Blut werden zusammen fraktioniert.

Fraktion	Extinktion
1	1292
3	1584
6	1715
9	1764
11	1380
15	1280

Fraktion	Extinktion
18	1294
21	1331
24	1350
27	1320

Die Fraktionen 1 - 26 werden dialysiert und lyophilisiert.

Der 3. Ansatz der 5, 5 l Citrat-Blut wird auf die Säule gegeben.

Fraktion	Extinktion
3	284
5	228
9	561
13	596
16	290
20	205
24	196
28	205
32	205
36	218
40	218
45	232
50	230
55	247

Die Fraktionen 5 - 16 werden dialysiert und lyophilisiert.

Der 4. Ansatz der 5, 5 l Citrat-Blut wird fraktioniert.

Fraktion	Extinktion
2	320
5	340
10	434
13	360
16	260
20	255
30	260

Fraktion	Extinktion
40	260
48	285

Die Fraktionen 2 - 13 werden dialysiert und lyophilisiert.

Weitere 5 l Citrat-Blut werden nach der o.g. Methode verarbeitet.

1. Ansatz	DE = 170	
1. Ansatz nach 2 Tagen	DE = 350	wird eingefroren
2. Ansatz nach 2 Tagen	DE = 410	wird eingefroren
3. Ansatz nach 2 Tagen	DE = 260	
3. Ansatz nach 4 Tagen	DE = 370	wird eingefroren
4. Ansatz nach 2 Tagen	DE = 180	
4. Ansatz nach 4 Tagen	DE = 160	verworfen

Der 1. Ansatz wird auf die Säule gegeben.

Fraktion	Extinktion
2	520
12	521
15	531
18	620
21	645
24	570
30	570
40	670
47	655

Die Fraktionen 18 - 47 werden dialysiert und lyophilisiert.

Der 2. Ansatz wird auf die Säule gegeben.

Fraktion	Extinktion
2	605
7	605
12	690
15	710
18	680
25	672

Fraktion	Extinktion
35	660
45	645
55	680
65	629

Die Fraktionen 10 - 65 werden dialysiert und lyophilisiert.

Der 3. Ansatz wird auf die Säule gegeben.

Fraktion	Extinktion
11	660
21	652
31	600
34	630
37	880
40	1053
43	875
46	660
50	650
55	660
60	648
70	641
80	645
90	649

Die Fraktionen 36 - 44 werden dialysiert und lyophilisiert.

III. VERSUCHSABLAUF

Tiere	1. Tag	2. Tag	3. Tag	4. Tag	5. Tag	6. Tag
1, 2, 3	re Ohr li Ohr 45 mg L 45 mg L _i	Exitus "				
4, 5, 6	re Ohr li Ohr 45 mg L 45 mg L _i	45 mg L 45 mg L _i	45 mg L 45 mg L _i	Exitus "		
7, 8, 9	re Ohr li Ohr 45 mg L 45 mg L _i	45 mg L 45 mg L _i	45 mg L 45 mg L _i	45 mg L 45 mg L _i	45 mg L 45 mg L _i	Exitus "
10, 11, 12	re Ohr li Ohr 675 µg P 67 µg P _i	Exitus "				
13, 14, 15	re Ohr li Ohr 675 µg P 67 µg P _i	675 µg P 67 µg P _i	675 µg P 67 µg P _i	Exitus "		
16, 17, 18	re Ohr li Ohr 675 µg P 67 µg P _i	675 µg P 67 µg P _i	675 µg P 67 µg P _i	675 µg P 67 µg P _i	675 µg P 67 µg P _i	Exitus "

L = Leukozyten-Proteasen
L_i = Leukozyten-Proteasen inaktiviert

P = Papain
P_i = Papain inaktiviert

F ZUSAMMENFASSUNG

- 1) Aus Blutkonserven wurden Leukozyten-Proteasen gewonnen und deren Aktivität bestimmt.
- 2) Von der pflanzlichen Protease Papain wurde die Menge bestimmt, die die gleiche Aktivität wie die Leuko-Proteasen hat.
- 3) Ein Teil der Leuko-Proteasen und von Papain wurde inaktiviert.
- 4) Wirkungsgleiche Lösungen aktiver wie inaktiver Enzyme wurden Laborratten ins Mittelohr gespritzt.
- 5) In den mit aktiven Enzymen behandelten Mittelohren fanden sich Ergüsse. Die Mittelohr-Schleimhaut wies entzündliche Veränderungen auf, die mit der Dauer der Einwirkung ausgeprägter wurden. An einigen Stellen der Paukenhöhlen-Schleimhaut sind an Stelle von normalem Epithel, Flimmerepithel und Becherzellen zu beobachten.
- 6) In den mit inaktiven Enzymen behandelten Ohren fanden sich schwächer ausgeprägte Zeichen der Entzündung. In keinem Fall war ein Erguß nachweisbar.

G LITERATURVERZEICHNIS

- 1) ARNOLD, W., Die Reaktion der Mittelohrschleimhaut
K.-H. VOSTEEN: bei Tubenverschluß
Acta Otolaryngol. Suppl. 330, 48-63 (1975)
- 2) BAGGIOLINI, M., Biochemical and Structural Properties of
U. BRETZ, the Vacuolar Apparatus of Polymorph-
B. DEWALD: nuclear Leukocytes
- 3) BAGGIOLINI, M., Subcellular Localization of Granulocyte
U. BRETZ, Enzymes erhalten von
B. DEWALD: Research Institute Wander, Berne,
Switzerland
- 4) BAGGIOLINI, M., Biochemical Characterization of Azurophil
U. BRETZ, and Specific Granules from Human and
B. GUSUS: Rabbit Polymorphnuclear Leukocytes
Schweiz. med. Wschr. 104, 129-132 (1974)
- 5) BAGGIOLINI, M., Further Biochemical and Morphological
J.G. HIRSCH, Studies of Granula Fractions from Rabbit
C. de DUVE: Heterophil Leukocytes
- 6) BAGGIOLINI, M., J. Cell. Biol. 40, 529 (1969)
J.G. HIRSCH,
C. de DUVE:
- 7) BARNHART, M.I., Anm. N.Y. Acad.Sci. 146, 527, (1968)
C. QUINTANA:
- 8) BLONDIN, J., The Role of Lysosomal Elastase in the
A. JANOFF: Digestion of Escherichia coli Proteins by
Human Polymorphnuclear Leukocytes
Experiment with Living Leukocytes
J. Clin. Invest. 58, 971-979, (1976)
- 9) BRETZ, U., Biochemical and Morphological Charac-
M. BAGGIOLINI: terization of Azurophil and Specific
Granules of Human Neutrophilic Poly-
morphnuclear Leukocytes
J. Cell. Biol. 63, 251-269, (1974)

- 10) COCHRANE, C. G., Polymorphnuclear Leukocytes in Reaction
B.S. AIKEN: immunologic: The Destruction of Vascular
Basement Membrane in vivo and in vivo
J. Exp. Med. 124, 733, (1966)
- 11) DEWALD, B., Subcellular Localization and Heterogenity
R. RINDLER- of Neutral Proteases in Neutrophilic
LUDWIG, U. BRETZ, Polymorphnuclear Leukocytes
M. BAGGIOLINI: J. Exp. Med. 141, 709 (1975)
- 12) GERBER, A. Ch., Partial Purification and Characterization
J. H. CARSON, of a Chymotrypsinlike Enzyme from
B. AADORN: Human Neutrophil Leukocytes
Bioch. Biophys. Acta 364, 103-112, (1974)
- 13) GROB, D.: Proteolytic Enzymes: III. Further Studies
on Protein, Polypeptide and other Inhibi-
tors of Serum Proteinase, Leucoproteinase,
Trypsin and Papain
J. Gen. Physiol. 33, 103, (1949)
- 14) GRÜNBERG, H.: Experimentelle Untersuchungen zur Wir-
kung einer Protease auf das Mittelohr
Archiv Ohren- usw. Heilk. u. Z. Hals- usw.
Heilk. 177, 522, (1961)
- 15) GÜNNEL, F.: Arch. Ohren- usw. Heilk. 173, 336, (1958)
- 16) HOCHSTRASSER, K., Über Vorkommen und Eigenschaften eines
H. HAENDLE: Proteaseninhibitors in menschlichem
Nasensekret
Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 352,
954-958, (1971)
- 17) HOCHSTRASSER, K.,
K. HOCHGESAND:
- 18) HOCHSTRASSER, K., Detection and Isolation of a second Acid
R. REICHERT, Stable Proteinase Inhibitor from Human
S. SCHWARZ: Bronchial Mucus
Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 354,
923-926, (1973)
- 19) HOCHSTRASSER, K., Isolierung und Charakterisierung eines
R. REICHERT, Proteaseninhibitors aus menschlichem
S. SCHWARZ: Bronchialsekret
Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 353,
221-226, (1972)

- 20) HUSSL, B.,
D.J. LIM: Drüsenzellen in normaler tierischer und menschlicher Mittelohrschleimhaut Arch.klin.exp. Ohr-, Nas.- u. Kehlk. Heilk. 193, 337, (1969)
- 21) IGNARRO, L.J.,
A.L. ORONSKY,
R.J. PERPER: Breakdown of Noncollagenous Chondromucoprotein Matrix by Leukocyte Lysosome Granule Lysates from Guinea Pig, Rabbit and Human Clin.Immunol.Immunopathol. 2, 36, (1973)
- 22) JANOFF, A.: At least three Human Neutrophil Lysosomal Proteases are capable of Degrading Joint Connective Tissue Ann.N.Y.Acad.Sci. 256, 402-408, (1975)
- 23) JANOFF, A.: Mediators of Tissue Damage in Leukocyte Lysosomes X.Further Studies an Human Granulocyte Elastase Lab.Invest. 22 (3), 228, (1970)
- 24) JANOFF, A.,
J. BLONDIN: The Effect of Human Granulocyte Elastase on Bacterial Suspensions Lab.Invest. 29 (4), 454, (1972)
- 25) JANOFF, A.,
J. BLONDIN: The Role of Elastase in the Digestion of E.coli Proteins by Human Polymorph-nuclear Leukocytes I.Experiments in vitro Proc.Soc.Exp.Med. 145, 1427-1430, (1974)
- 26) JANOFF, A.,
G. FEINSTEIN,
Ch.J. MALEMUD,
M. ELIAS: Degradation of Cortilage Proteoglycans by Human Leukocyte Granule Neutral Protease - A Model of Joint Injury I.Penetration of Enzyme into Rabbit Articular Cartilage and Release of $^{35}\text{SO}_4$ - labeled Material from Tissue J.Clin.Invest. 57, 615-624, (1976)
- 27) JANOFF, A.,
J. SCHERER: Mediators of Inflammation in Leukocyte Lysosomes IX.Elastinolytic Activity in Granules of Human Polymorphnuclear Leucocytes J.Exp.Med. 128, 1137-1155, (1968)
- 28) JANOFF, A.,
J.D. ZELIGS: Vascular Injury and Lysis of Basement Membrane in vitro by Neutral Protease of Human Leukocytes Science 161, 702-704, (1968)

- 29) KEISER, H.,
R.A. GREENWALD,
G. FEINSTEIN,
A. JANOFF: Degradation of Cortilage Proteoglycans
by Human Leukocyte Granule Neutral
Protease - A Model of Joint Injury
II. Degradation of isolated Bovine
Cartilage Proteoglycans
J.Clin.Invest. 57, 625-632, (1976)

- 30) LAURELL, C.B.,
S. ERIKSSON: The electrophoretic α_1 -globulin
Pattern of Serum in α_1 -antitrypsin
Deficiency
Scand.J.Lab.Invest. 15, 132-140, (1969)

- 31) LAZARUS, G.S.: Human Granulocyte Collagenase
Science 159, 1483, (1968)

- 32) LIM, D.J.,
M.M. PAPARELLA,
R.S. KIMURA: Acta Otolaryngol. 63, 425, (1967)

- 33) MOUNTER, L.A.,
W. ATIYEH: Blood 15, 52, (1960)

- 34) MOVAT, H.Z.,
S.G. STEINBERG: Demonstration of a Kinin-generating En-
zyme in the Lysosomes of Human Poly-
morphnuclear Leukocytes
Lab.Invest. 29 (6), 669, (1973)

- 35) MURPHY, G.,
J.J. REYNOLDS,
U. BRETZ,
M. BAGGIOLINI: Collagenase is a Component of the Specific
Granules of Human Neutrophil Leukocytes
Biochem.J. 162, 195-197, (1977)

- 36) OHLSSON, K.: α_1 -antitrypsin and α_2 -macro glo-
bulin
Interactions with Human Neutrophilic
Collagenase and Elastase
Ann.N.Y.Acad.Sci. 256, 409-419,(1975)

- 37) OHLSSON, K.,
I. OLSSON: The Neutral Proteases of Human Leukocytes
Isolation and Partial Characterization of
Two Granulocyte Collagenases
Eur.J.Biochem. 36, 473-481, (1973)

- 38) OHLSSON, K.,
I. OLSSON: The Neutral Proteases of Human Granulo-
cytes
Isolation and Partial Characterization of
Granulocyte Elastases
Eur.J.Biochem. 42, 519-527, (1974)

- 39) OHLSSON, K.,
I. OLSSON: Neutral Proteases of Human Granulocytes
III. Interactions between Human Granu-
locyte Elastase and Plasma Protease
Inhibitors
Scand.J.Clin.Lab.Invest. 34 (4), 349-355,
(1974)
- 40) OHLSSON, K.,
I. OLSSON: Neutral Proteases of Human Granulocytes
IV. Interactions between Human Granulo-
cyte Collagenase and Plasma Inhibitors
J.Lab.Clin.Med. 89, (2), 269-277, (1977)
- 41) OHLSSON, K.,
I. OLSSON,
M. DELSHAMMAR,
H. SCHIESSLER: Elastases from Human and Canine
Granulocytes
I. Some Proteolytic and Esterolytic
Properties
- 42) OHLSSON, K.,
I. OLSSON,
J.K. SPITZNAGEL: Localization of Chymotrypsin-like Cationic
Protein, Collagenase and Elastase in
Azurophil Granules of Human Neutrophilic
Polymorphnuclear Leukocytes
Hoppe-Seyler's Z.Physiol.Chem. 358,
361-366 (1977)
- 43) OHLSSON, K.,
H. TEGNER: Inhibition of Elastase from Granulocytes
by the Low Molecular-Weight Bronchial
Protease Inhibitor
Scand.J.clin.Lab.Invest. 36, 437, (1976)
- 44) OHLSSON, K.,
H. TEGNER,
U. AHESSON: Isolation and Partial Characterization of a
Low Molecular-Weight Acid Stable Protease
Inhibitor from Human Bronchial Secretion
Hoppe-Seyler's Z.Physiol.Chem. 358,
583-589, (1977)
- 45) POWERS, J.C.,
P.M. TUHY: J.Am.Chem.Soc. 94, 6544, (1972)
- 46) PROKOPOWICZ, J.; Thromb.Diath.Haemorrh. 19, 84, (1968)
- 47) PROKOPOWICZ, J.,
S. NIEWIAROWSKI: Bull.Acad.Pol.Sci. 16, 261, (1968)
- 48) REICHERT, R.,
K.HOCHSTRASSER,
W. ELGAS: Der Nachweis eines niedermolekularen
Proteaseninhibitors in den Schleimhäuten
der Atemwege
Mschr.Ohr.Hk. Wien 107 (7), 331-334,
(1973)

- 49) RINDLER-LUDWIG, R.,
H. BRAUNSTEINER: Cationic Proteins from Human Neutrophilic Granulocytes
Evidence of their Chymotrypsin-like Properties
Bioch. Biophys. Acta 36951
- 50) RINDLER, R.
F. SCHMALZL,
H. BRAUNSTEINER: Isolierung und Charakterisierung der chymotrypsin-ähnlichen Protease aus neutrophilen Granulozyten des Menschen
Schweiz. med. Wschr. 104, 132-133, (1974)
- 51) SCHIESSLER, H.,
K. OHLSSON,
I. OLSSON: Elastase from Human and Canine Granulocytes II Interaction with Protease Inhibitors of Animal, Plant, and Microbial Origin
Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 358, 53-58, (1977)
- 52) SEEMÜLLER, U.,
M. MEIER,
K. OHLSSON: Isolation and Characterization of a Low Molecular Weight Inhibitor (of Chymotrypsin and Human Granulocyte Elastase and Cathepsin G) from Leeches
Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 358, 1105-1117, (1977)
- 53) SENIOR, R.M.,
H. TEGNER,
C. KUHN,
K. OHLSSON: The Induction of Pulmonary Emphysema with Human Leukocyte Elastase
Am. Rev. Resp. Dis. 116, 469, (1977)
- 54) STEIN, W.H. u.
S. MOORE: J. Biol. Chem. 221, 151-157, (1965)
- 55) TEGNER, H.,
K. OHLSSON: Localization of a Low Molecular-Weight Protease Inhibitor to Tracheal and Maxillary Sinus Mucosa
Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 358, 425-429, (1977)
- 56) TEGNER, H.,
K. OHLSSON,
I. OLSSON: The Interactions between a Low Molecular Weight Protease Inhibitor of Bronchial Mucus and Chymotrypsin-like Cationic Proteins of Granulocytes
Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 358, 431-433, (1977)
- 57) THORNE, K.J.,
R.C. OLIVER,
A.J. BARRETT: Lysis and Killing of Bacteria by Lysosomal Proteinases
Inf. Imm. 14 (2), 555-563, (1976)

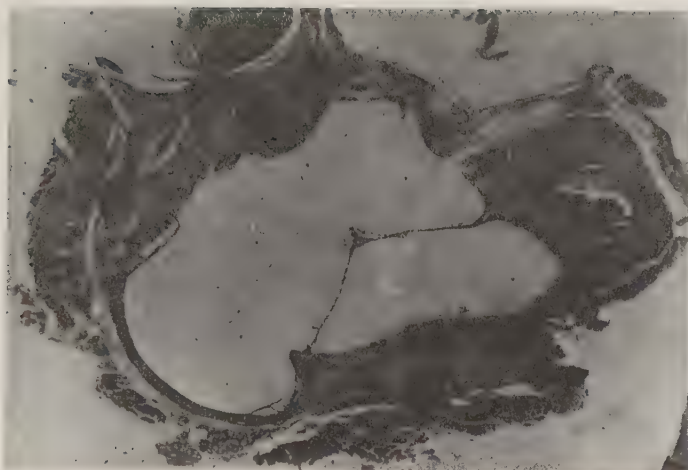


Abb. 1

Lichtmikroskopisch normales Mittelohr

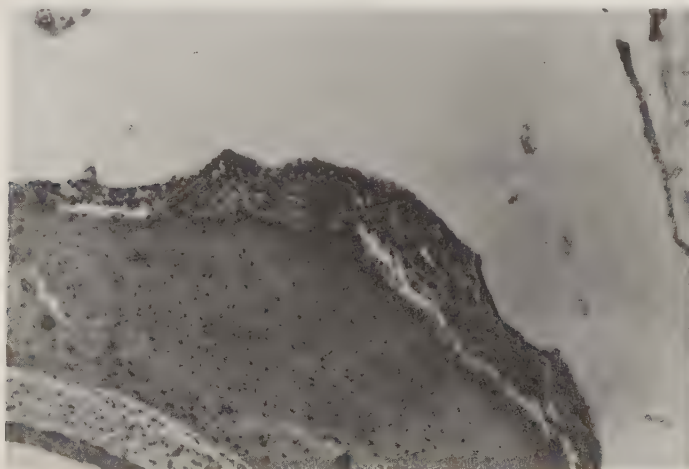


Abb. 2

Mehrschichtige Paukenhöhlenschleimhaut, zellig infiltriert
Kubisches bis zylindrisches Epithel

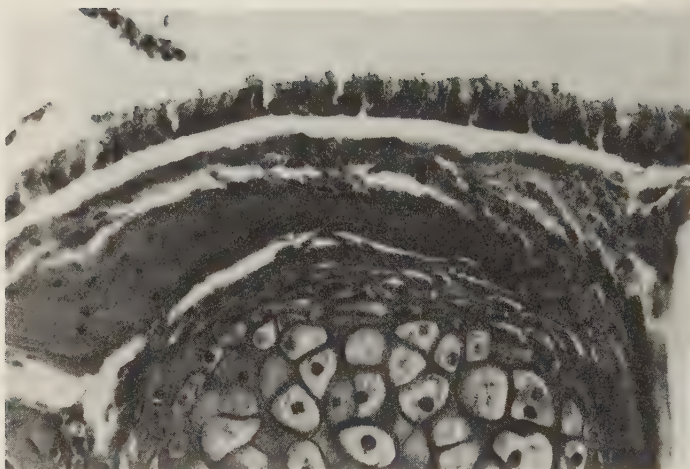


Abb. 3

Becherzellen und Flimmerepithel um das Tubenostium
Tubenknorpel (TK)

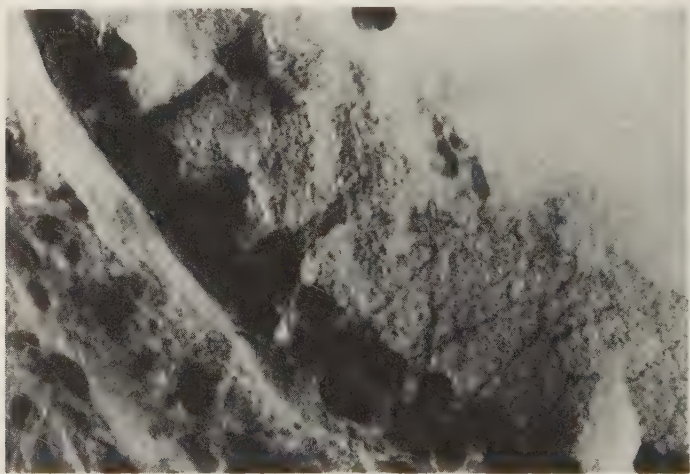


Abb. 4

Becherzellen

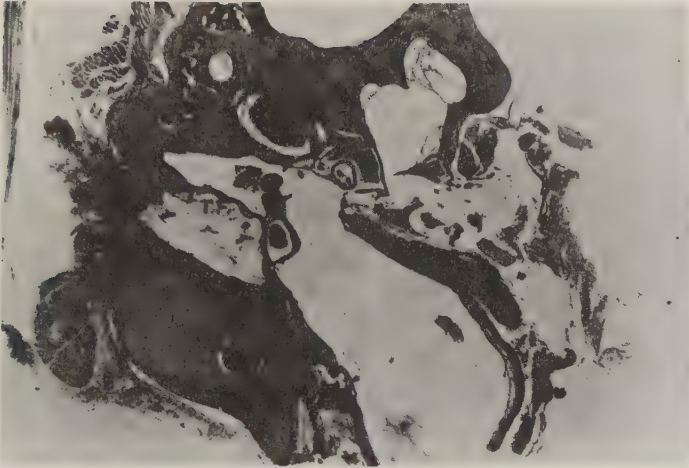


Abb. 5

Verdicktes Trommelfell (TK)

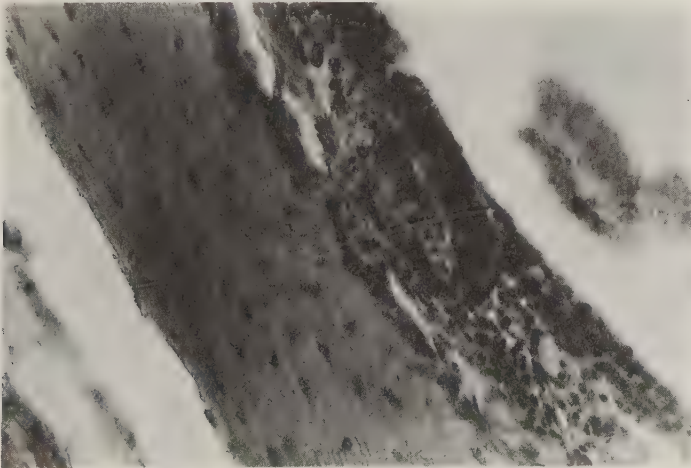


Abb. 6

Prall mit Erythrozyten gefüllte Kapillare (K)

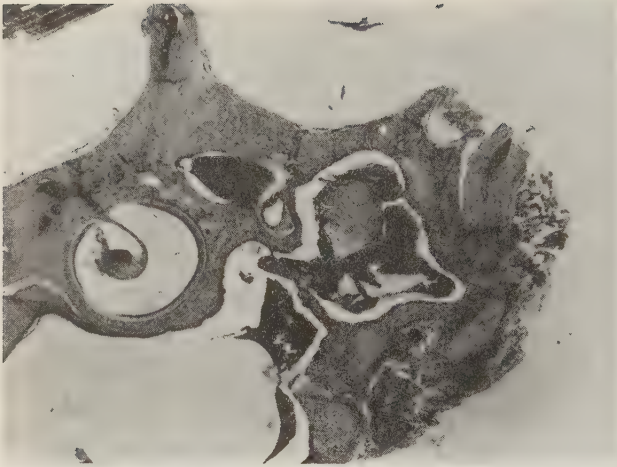


Abb. 7

Hämorrhagischer Erguß

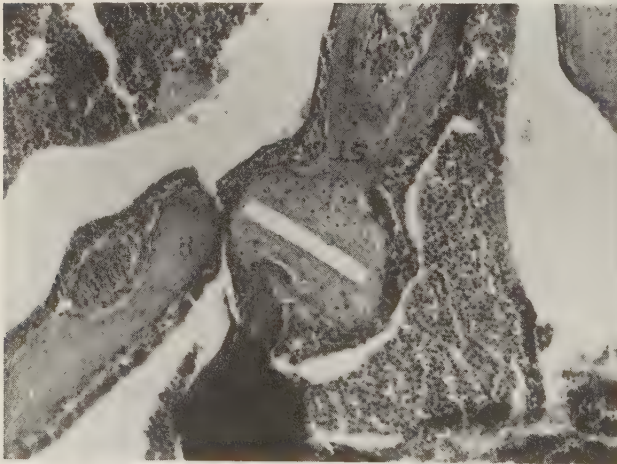


Abb. 8

Ausschnittvergrößerung v. Abb. 7

Hammer (H) und Steigbügel (ST)

Schleimhaut verdickt und zellig infiltriert

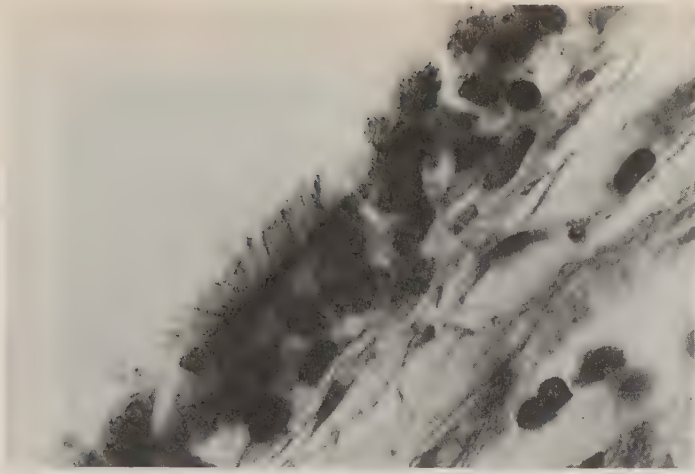


Abb. 9

Flimmerepithel



Abb. 10

Zellig infiltrierte, verdickte Schleimhaut

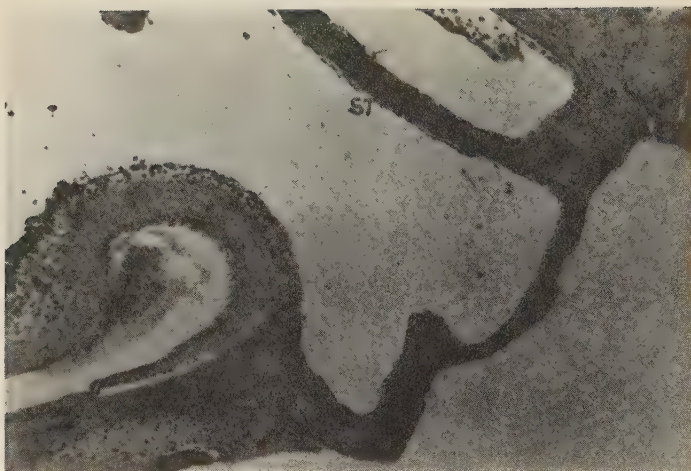


Abb. 11

Steigbügel (ST) von normaler Paukenschleimhaut umgeben

LEBENS LAUF

Am 20.8.50 wurde ich als erstes Kind des damaligen Maurers Helmut Eberding und seiner Ehefrau Sontraud Eberding, geb. Hille in Dresden geboren.

Von September 1957 bis Juli 1961 besuchte ich die 10-klassige polytechnische allgemeinbildende Oberschule in Dresden-Loschwitz.

Im Juli 1961 übersiedelten wir von Dresden nach Berlin-Ost. Am 27.6.1961 gelang uns die Flucht über West-Berlin nach München.

Von September 1961 bis Juni 1970 besuchte ich das Luisengymnasium in München, wo ich am 20.6.1970 das Reifezeugnis erhielt.

Von Oktober 1970 bis Februar 1971 studierte ich an der Ludwig Maximilians-Universität München Tiermedizin, bevor ich die Zulassung zur Zahnmedizin bekam. In diesem Fach legte ich im Frühjahr 1972 meine naturwissenschaftliche Vorprüfung mit Erfolg ab. Im Sommer 1973 bestand ich die zahnärztliche Vorprüfung mit Erfolg. Auf Grund akuten Platzmangels in der Universitäts-Zahnklinik in München mußte ich 1 Semester warten, so daß ich die zahnärztliche Prüfung erst im Winter 1976/77 ablegen konnte.

Von Mai 1977 bis Mai 1978 arbeitete ich als Zahnärztin in Wolnzach bei Dr. S. Seuffer, seit Juni 78 bin ich bei Dr. G. Schwab in Scheyern als Zahnärztin beschäftigt.

